

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sistemática molecular del complejo *Carollia castanea* Allen 1890 (Chiroptera: Phyllostomidae)
en el Ecuador

Disertación previa a la obtención del Título de
Licenciada en Ciencias Biológicas

SARAH DENISSE VACA PUENTE

Quito, 2015

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Sarah Denisse Vaca Puente ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Santiago F. Burneo

Director de la disertación

Diciembre de 2015

*A mis queridos padres
y a mi hermana Romi*

SISTEMÁTICA MOLECULAR DEL COMPLEJO *Carollia castanea* Allen 1890 (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) EN EL ECUADOR

Sarah D. Vaca

Museo de Zoología, Sección Mastozoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Av. 12 de Octubre 1076 y Roca, Quito, Ecuador. [Correspondencia: Sarah D. Vaca <sdvacap@gmail.com>].

RESUMEN: El género *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae) se distribuye en el Neotrópico y presenta gran abundancia en diferentes ecosistemas. Análisis morfológicos y moleculares recientes han resultado en la descripción de nuevas especies dentro del género, como es el caso de *C. benkeithi*. *Carollia castanea* es la especie más pequeña y con mayor diferencia morfológica y molecular dentro del género por lo que es considerada un complejo de especies. Presenta una amplia distribución en el Neotrópico, en Ecuador se distribuye en la costa, oriente y estribaciones de los Andes, desde el nivel del mar hasta los 1700 m de altitud. En el presente estudio se realizaron análisis filogenéticos dentro del complejo *C. castanea*, mediante análisis moleculares usando los genes mitocondriales Citocromo-*b* (Cyt-*b*) y Citocromo Oxidasa I (COI) en 158 secuencias de especímenes identificados como *C. castanea* de Ecuador. Además, verificar la presencia o ausencia de *C. benkeithi* en el Ecuador, y determinar la distribución de los posibles nuevos linajes dentro del complejo *C. castanea* en Ecuador. Se usaron secuencias de *C. brevicauda*, *C. perspicillata*, *Rhinophylla fischerae*, *Micronycteris nicefori*, *Sturnira erythromos* y *Mormoops megalophylla* como grupos externos. Se obtuvieron tres clados dentro del complejo *C. castanea*, de los cuales dos se encuentran en Ecuador, el clado B se distribuye en Centroamérica y al occidente de los Andes y corresponde a *C. castanea* sensu stricto. Mientras que el clado C se distribuye al oriente de los Andes y corresponde a una especie candidata no confirmada para Ecuador. Se confirma la ausencia de *C. benkeithi* en Ecuador.

Palabras clave: *Carollia castanea*, COI, Cyt-*b*, complejo de especies, filogenia, sistemática.

ABSTRACT: The genus *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae) is distributed in the Neotropics and is abundant in different ecosystems. Morphological and molecular analyses have resulted in the description of new species within the genus, as is the recent case of *C. benkeithi*. *Carollia castanea* is the smallest species and has the most morphological and molecular differences within the genus, so it is considered a species complex. Is widely distributed in the Neotropics, in Ecuador is distributed along the coast, the east and the foothills of the Andes, from sea level to 1,700 m altitude. In the present study we sought to describe phylogenetic groups using 158 cytochrome *b* (Cyt-*b*) and Cytochrome Oxidase I (COI) mitochondrial gene sequences from specimens identified as *C. castanea* of Ecuador. Besides, we checked for the presence or absence of *C. benkeithi* in Ecuador, and determine the distribution of possible new lineages within the complex *C. castanea* in Ecuador. As outgroups sequences of *C. brevicauda*, *C. perspicillata*, *Rhinophylla fischerae*, *Micronycteris nicefori*, *Sturnira erythromos* and *Mormoops megalophylla* were used. Three clades were obtained from the complex *C. castanea*, which two are in Ecuador, clade B is distributed in Central America and west of the Andes and corresponds to *C. castanea* sensu stricto. Clade C is distributed east of the Andes and corresponds to an unconfirmed candidate species for Ecuador. The absence of *C. benkeithi* in Ecuador is confirmed.

Key Words: *Carollia castanea*, COI, Cyt-*b*, species complex, phylogeny, systematics.

INTRODUCCIÓN

Los murciélagos son uno de los grupos de mamíferos más diversos en el mundo, se distribuyen en todo el planeta con excepción de los polos (Mickleburgh et al., 2002). Presentan una amplia distribución y diversidad en el Neotrópico (Clare et al., 2011). Estos mamíferos poseen adaptaciones únicas dentro de su clase, como la capacidad de volar, el desarrollo de un complejo sistema de ecolocación y adaptaciones particulares a diversos hábitos alimenticios (Tirira, 2007).

El orden Chiroptera en Ecuador es el grupo de mamíferos con mayor número de especies. Incluye ocho familias, 63 géneros y 171 especies reportadas, de las cuales siete son endémicas (Tirira, 2015). Se distribuyen en todo el país, incluyendo a la región insular, y pueden alcanzar hasta los 4500 m sobre el nivel del mar (Tirira, 2007). La familia Phyllostomidae, nativa del

Neotrópico, es una de las de mayor diversidad a nivel morfológico, en el Ecuador están representadas seis subfamilias, 38 géneros y 110 especies (Tirira, 2015).

El género *Carollia* pertenece a la familia Phyllostomidae. Es uno de los géneros de mamíferos más comunes y de más amplia distribución en el Neotrópico (Fleming, 1988); presenta especies generalistas y con gran adaptación a diferentes tipos de hábitat (Tirira, 2007). Hasta 2001 se reconocían cuatro especies: *C. perspicillata* Linnaeus 1758, *C. brevicauda* Schinz 1821, *C. castanea* Allen 1890 y *C. subrufa* Hahn 1905; sin embargo, en los últimos años se han descrito cuatro especies más (McLellan y Koopman, 2007), *C. sowellii* Baker et al. 2002, *C. manu* Pacheco et al. 2004, *C. monohernandezii* Muñoz et al. 2004 y *C. benkeithi* Solari y Baker 2006. De estas nuevas especies, algunas se describieron a partir de análisis morfométricos y moleculares, principalmente a partir de secuencias de ADN mitocondrial (*C. sowellii* y *C. benkeithi*) y otras han sido descritas únicamente con análisis morfológicos y morfométricos (*C. manu*, *C. monohernandezii*; Pacheco et al., 2004; Muñoz et al., 2004).

En 2004 se describió *Carollia colombiana* a partir de análisis morfológicos y morfométricos de tres individuos capturados en el departamento de Antioquía en Colombia (Cuartas et al., 2001). Sin embargo, McLellan y Koopman (2007) concluyeron que los especímenes identificados como *C. colombiana* parecen ser *C. castanea*. Adicionalmente, Zurc y Velazco (2010) usando análisis morfológicos y morfométricos, indicaron que *C. colombiana* no presenta diferencias significativas en relación a *C. brevicauda* y sugieren que *C. colombiana* es un sinónimo menor de *C. brevicauda*.

Desde la revisión del género *Carollia* hecha por Ronald Pine en 1972, a partir de comparaciones morfométricas y morfológicas, se indicó que podrían haber más especies de las descritas hasta esa fecha, debido a que muchos de los especímenes analizados presentaban rasgos morfológicos o morfométricos que no correspondían a una de las especies determinadas. Por otro lado McLellan (1984) usando técnicas morfométricas concluyó que las especies dentro del género presentaron diferencias en la morfología del cráneo de acuerdo a la variación geográfica, y presentaron dimorfismo sexual, siendo los machos de mayor tamaño en comparación a las hembras. Las variaciones morfológicas entre las especies del género *Carollia* pueden deberse a que los caracteres usados para la identificación de las mismas no fueron definidos apropiadamente, o a que la identificación a nivel de especie se la realizó usando un único

individuo colectado, o porque los caracteres no han sido definidos apropiadamente (Pacheco et al., 2004; Muñoz et al., 2004). McLellan y Koopman (2007) separan las especies dentro del género a lo largo de su distribución, de acuerdo a caracteres morfológicos de diagnóstico, sin embargo para muchas de las especies todavía resulta difícil encontrar caracteres morfológicos específicos, por la subjetividad de los mismos, a pesar del gran número de especímenes presentes en las colecciones (Zurc y Velazco, 2010; Murillo, 2014). En 2003 Hoffmann y Baker de acuerdo a análisis filogenéticos usando especímenes de Centroamérica y Sudamérica, indican que *C. castanea* es un clado hermano de un segundo clado formado por las cuatro especies de *Carollia* de Sudamérica reconocidas hasta la fecha (*C. perspicillata*, *C. brevicauda*, *C. sowellii* y *C. subrufa*; **Fig. 1a**). A su vez, *C. castanea* presentó la divergencia genética más alta dentro del género, del 5,3 % (Hoffmann y Baker, 2003); sugiriendo que *C. castanea* es un complejo de especies (Bradley y Baker, 2001; Hoffmann y Baker, 2003; Solari y Baker, 2006). Por otro lado en el mismo estudio, encuentran cuatro clados dentro de *C. castanea*, los cuales se encuentran separados por la cordillera de Los Andes; de los cuatro clados, dos se restringen a la Amazonía y dos a Centroamérica y la Costa del Pacífico en Sudamérica. La divergencia genética en los cuatro clados de *C. castanea* es igual o mayor comparada con la divergencia del clado formado por las cuatro especies del género *Carollia* de Sudamérica (*C. perspicillata*, *C. brevicauda*, *C. sowellii* y *C. subrufa*; Hoffmann y Baker, 2003).

Por otro lado en el 2006 Solari y Baker encontraron diferencias a nivel morfológico y genético dentro del complejo *C. castanea*, con lo cual se describe a *Carollia benkeithi*. Actualmente se desconoce la extensión del rango de distribución de *C. benkeithi*, se presume que podría abarcar el este de Perú, noreste de Bolivia y oeste de Brasil (Solari y Baker, 2006). Se indica un tercer clado dentro del complejo que correspondería a una nueva especie no descrita (**Fig. 1b**), restringida al oriente de Ecuador y el nororiente de Perú. Para este clado usaron ocho especímenes de Ecuador y uno de Perú.

En el reciente estudio de Velazco (2013), con el objetivo de entender la evolución y diversificación de *C. manu*, se realizaron análisis moleculares de especies del género *Carollia* usando citocromo-*b*. Los resultados afirmaron la monofilia del género, reconociendo nueve linajes (*C. benkeithi*, *C. brevicauda*, *C. castanea*, *C. manu*, *C. perspicillata*, *C. sowellii*, *C. subrufa*, *Carollia* sp.1 y *Carollia* sp.2; **Fig. 1c**), una de las especies no descritas corresponde al

clado hermano de *C. benkeithi* que reconocen Solari y Baker en 2006. Pocos fueron los especímenes usados en este clado no descrito, cuatro de Ecuador y uno de Perú.

Carollia castanea es la especie más pequeña, con mayor variabilidad morfológica y genética dentro del género (McLellan, 1984; Hoffmann y Baker, 2003; Solari y Baker, 2006). Se distribuye en Honduras, Nicaragua, Costa Rica (localidad tipo), Panamá, Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam, Guyana Francesa, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil (Solari y Baker, 2006). Su rango de distribución para el Ecuador es amplio, en la costa, oriente y estribaciones de los Andes (Tirira, 2007; Albuja, 2011), desde el nivel del mar hasta los 1700m de altitud (Tirira, 2007).

Para medir el grado de divergencia que existe entre taxones se usan distancias genéticas, las cuales explican que dos poblaciones pueden ser especies separadas, o que muchas poblaciones pertenecen a una misma especie (Ferguson, 2002). En 2001 Bradley y Baker proponen un rango para evaluar la diversidad genética usando genes mitocondriales, principalmente Citocromo-*b*. El rango de comparación entre especies hermanas sugerido para murciélagos indica que los valores de distancias genéticas menores al 2.5% indicarían variación interespecífica, valores entre 2.5% y 16.4% indican posible variación entre especies y sugiere estudios adicionales para determinarlas, y los valores mayores a 16.4% indicarían reconocimiento específico del taxón. Mientras que el rango de variación intraespecífica sugerido para murciélagos es de 0.09% a 8.70% (Bradley y Baker, 2001).

Se han usado los genes mitocondriales Citocromo-*b* (Cyt-*b*) y Citocromo Oxidasa I (COI) en varios estudios filogenéticos de murciélagos (Baker et al., 2003; Hoffmann y Baker, 2003; Solari y Baker, 2006; Clare et al., 2007; Clare et al., 2001; McDonough et al., 2011; Velazco y Patterson, 2013; Velazco, 2013; Velazco y Lim, 2014). El gen Citocromo-*b* ha descifrado relaciones evolutivas dentro del género *Carollia*, aportando una idea más clara de la taxonomía de este grupo (Baker et al., 2002; Solari y Baker, 2006), debido a que posee una alta tasa de evolución por lo que acumula mayor número de mutaciones (Irwin et al., 1991; Krebs et al., 2013). Este gen comprende 1140 pares de bases en murciélagos (Bradley y Baker, 2001). El “DNA barcoding” o Código de barras del ADN es un sistema de identificación de especies, el cual utiliza una pequeña sección del ADN a partir de una región estándar del genoma (Hebert et al., 2003). El marcador genético comúnmente usado es Citocromo Oxidasa I debido a que se

utiliza una región de 648 pares de bases (Hebert et al., 2003) dentro de un gen que comprende de 657 a 658 pares de bases (Clare et al., 2007)

El presente estudio tuvo como objetivos determinar la sistemática de las poblaciones del complejo *Carollia castanea* en el Ecuador a partir de análisis de marcadores mitocondriales, determinar la distribución de los posibles nuevos linajes dentro de este complejo y evaluar la presencia de *C. benkeithi* en el país.

METODOLOGÍA

Extracción, amplificación y secuenciamiento de ADN

Se usaron 20 muestras de tejidos de hígado, piel y músculo de especímenes de *Carollia castanea* del Ecuador, perteneciente a las colecciones de la Sección Mastozoología del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ-M) y del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN).

Para la extracción de ADN se usó el protocolo de tiocinato de guanidina, usado en el Laboratorio de Biología Molecular del Museo de Zoología de la PUCE (**Apéndice 1**). Se amplificaron los genes mitocondriales Citocromo *b* (Cyt-*b*) y Citocromo Oxidasa I (COI). Para amplificar Cyt-*b* se usó los primers glo7L y glo6H, siguiendo el método de Hoffmann y Baker (2001); mientras que para amplificar COI se usó el cóctel de primers C_VF1di/C_VR1di (Ivanova et al, 2006), siguiendo el método de Clare et al. (2007) (**Apéndice 2**).

Análisis filogenéticos

Las secuencias fueron editadas en Geneious 5.4.7 y alineadas con la herramienta ClustalW; los modelos evolutivos se obtuvieron por medio del programa PartitionFinder (Lanfear et al., 2012). Los modelos usados para el gen Cyt-*b*: 1ra pos K80+I+G, 2da pos HKY+I y 3ra pos GTR+I; y para el gen COI: 1ra pos SYM+G, 2da pos F81 y 3ra pos GTR. Se analizaron las secuencias con los criterios de Inferencia Bayesiana (IB) y Máxima Verosimilitud (MV), por su amplio uso en análisis filogenéticos (Lemey et al., 2009)

Para el criterio de Inferencia Bayesiana se usó el programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), para calcular las probabilidades posteriores se corrieron simultáneamente cuatro cadenas Markov Monte Carlo por diez millones de generaciones, se muestrearon los árboles cada

1000 generaciones, se visualizó la convergencia de las cadenas con los valores de probabilidad (-lnL) por generación en el programa Tracer v1.5 (Drummond y Rambaut, 2009).

Para obtener el árbol de Máxima Verosimilitud se usó GARLI 2.0 (Zwickl, 2006). Se usó la técnica de bootstrap no paramétrico para evaluar el soporte de cada nodo y se realizaron dos búsquedas con 500 réplicas para cada gen y para los datos combinados.

Para la construcción de los árboles filogenéticos se incluyeron secuencias de *C. castanea* y *C. benkeithi* obtenidas del GenBank (NCBI, 2015). Como grupos externos se usaron secuencias de *C. brevicauda* y *C. perspicillata*, *Rhinophylla fischeriae*, *Micronycteris nicefori*, *Sturnira erythromos* y *Mormoops megalophylla*. Todas las secuencias de los especímenes usados para este estudio se presentan en el **Apéndice 3**. Cabe mencionar que no se realizaron análisis de COI para *C. benkeithi* debido a la ausencia de secuencias de la especie para este gen en GenBank.

Distancias genéticas

Se calcularon distancias genéticas p corregidas y no corregidas, mostrando mayor énfasis en las corregidas. Algunos autores sugieren el uso de distancias corregidas en base a uno o varios modelos evolutivos, sin embargo, en la actualidad se continúa usando distancias p no corregidas en trabajos filogenéticos de mamíferos (Lemey et al., 2009). Se utilizó el programa MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) para calcular las distancias genéticas p corregidas y no corregidas; y para las distancias corregidas se usó el modelo Kimura de 2 parámetros. Se calcularon distancias únicamente para el gen mitocondrial Cyt- *b*.

Mapas de distribución

Para determinar la distribución de los linajes caracterizados dentro del complejo *C. castanea* en el Ecuador se construyó un mapa de distribución que incluye todos los linajes resultantes del análisis filogenético. Se usaron las coordenadas geográficas de los individuos de *C. castanea* de las colecciones revisadas y datos de presencia obtenidos del *Global Biodiversity Information Facility* de Colombia y Perú para complementar vacíos de información en las fronteras de Ecuador (GBIF, 2015), los cuáles fueron revisados y validados mediante Sistemas de Información Geográfica (**Apéndice 4**).

RESULTADOS

Se obtuvieron 72 secuencias de Citocromo *b* (Cyt-*b*) de 1140 pb y 86 secuencias de Citocromo Oxidasa I (COI) de 602 pb.

Los análisis de Probabilidad posterior (PP) de Inferencia Bayesiana (IB) y bootstrap de Máxima Verosimilitud (MV) para Cyt-*b* y COI mostraron topologías similares, con clados con alto soporte. Cabe mencionar que no se pudo elaborar un árbol concatenado de Cyt-*b* y COI, debido a que las secuencias obtenidas de GenBank fueron de diferentes individuos.

Tres clados (A, B y C) se diferenciaron dentro del complejo *C. castanea* (**Figs. 2 y 3**), de los cuales dos se encuentran en Ecuador (B y C); lo cual demuestra la parafilia fuertemente soportada dentro del complejo.

El clado A incluye a individuos restringidos al suroriente de Panamá, presenta un alto soporte y clara resolución filogenética, con valores de $PP \geq 0.95$ y bootstrap $\geq 75\%$ para Cyt-*b* y COI.

El clado B es clado hermano del clado A, incluye individuos de Centroamérica y la costa del Pacífico ecuatoriano, mas no de individuos de Colombia. Presenta un alto soporte y clara resolución filogenética, con valores de $PP \geq 0.95$ y bootstrap $\geq 75\%$ para los dos genes mitocondriales. En el análisis de Cyt-*b* este clado se divide en dos subclados (**Fig. 2**), el subclado BI incluye individuos de Centroamérica ($PP = 0.95$ / bootstrap = 95%) y presenta un alto soporte y clara resolución filogenética; el subclado BII incluye individuos del lado occidental de la cordillera de los Andes en Ecuador, con un soporte menor al del subclado BI ($PP = 0.99$ / bootstrap = 63%). El análisis de COI no presentó esta división de subclados para el clado B.

El clado C corresponde a los individuos del lado oriental de la cordillera de los Andes en Ecuador. Este clado presenta internamente una clara resolución filogenética y un alto soporte para Cyt-*b*, con valores de $PP \geq 0.95$ y bootstrap $\geq 75\%$. En el caso de COI, no hubo una resolución filogenética muy clara, presenta valores de $PP \leq 0.95$ y bootstrap entre 50% y 75% (**Fig. 3**).

Carollia benkeithi es especie hermana del clado C e incluye individuos de Perú y Bolivia. Presenta un alto soporte y clara resolución filogenética con valores de $PP \geq 0.95$ y bootstrap $\geq 75\%$ para Cyt-*b* (**Fig. 2**).

La relación entre el clado C y *C. benkeithi* reveló valores de $PP \leq 0.95$ y bootstrap entre 50% y 75% (**Fig. 2**), lo cual demuestra un bajo soporte entre estos dos grupos.

Los promedios de distancias genéticas p corregidas entre los clados resultantes del complejo *C. castanea* varían entre 4.4% (Clado A - Clado B) y 9.4% (Clado B – Clado C) (**Tabla 1**). Mientras que las distancias genéticas p no corregidas van de 4.3% (Clado A - Clado B) a 8.6% (Clado B – Clado C) (**Tabla 2**).

Los valores de las distancias genéticas p corregidas y no corregidas entre los dos subclados del clado B son bajas (1.74% distancia p corregida y 1.71% no corregida) (**Tabla 3**). Estos valores indican la variación genética entre los subclados BI y BII, que corresponden a individuos de Centroamérica y el occidente de los Andes, respectivamente.

De acuerdo al mapa de distribución (**Fig. 4**) del complejo *C. castanea* en el Ecuador, el clado B, *C. castanea* sensu stricto, se distribuye al occidente de la cordillera y el clado C (especie candidata no confirmada) al oriente de la cordillera de los Andes. Asimismo, se pudo observar que el mayor número de individuos colectados se encuentra al norte del país, distribuidos principalmente en tierras bajas.

DISCUSIÓN

Los análisis filogenéticos indican que *Carollia castanea* es parafilética debido a que está conformada por tres clados (A, B y C). Los clados A y B son hermanos, a su vez el clado C es hermano de *C. benkeithi*, y estos cuatro grupos conforman lo que previamente se conocía como el complejo *C. castanea* (**Fig. 1**).

Los valores de PP (1.00) y bootstrap (100%) obtenidos en el clado A para *Cyt-b* demuestran un soporte alto dentro de la filogenia, y coinciden con los obtenidos en los trabajos de Hoffmann y Baker (2003) y Velazco (2013) (**Figs. 1a y 1c**). El valor de variación intraespecífica para el clado A es bajo (0.27%) (**Tabla 1**) a pesar de encontrarse dentro del rango determinado por Bradley y Baker (2001) (el rango de variación intraespecífica sugerido va de 0.09% a 8.70% para murciélagos); sin embargo, este dato no fue considerado confiable debido a que sólo se usaron dos individuos para el análisis. El alto soporte del clado B ha sido mencionado

en trabajos previos (Hoffmann y Baker, 2003; Velazco, 2013), con valores de $PP \geq 0.95$ y $bootstrap \geq 75\%$ para *Cyt-b*, información que es apoyada por el presente estudio, en el cual se han usado seis secuencias de Centroamérica y 11 de Ecuador.

El clado B para *Cyt-b* está conformado por los subclados BI y BII, que de acuerdo a los valores de PP y bootstrap presentan un alto soporte y clara resolución filogenética, similares a los obtenidos por Hoffmann y Baker en 2003. Sin embargo, los valores de distancias p corregidas y no corregidas son bajos (**Tabla 3**), menores al 2.5% sugerido por Bradley y Baker (2001) como variación entre especies hermanas de murciélagos. A pesar de que los valores obtenidos en este estudio son bajos, son similares a los valores de distancias genéticas usados para separar otras especies de murciélagos, como es el caso de una nueva especie de *Sturnira* que fue separada de *S. luisi* y *S. paulsoni* con 1.9% (distancia p no corregida) (Velazco y Patterson, 2013). No obstante faltan muestras de Colombia para completar el posible rango de distribución del clado B. Al añadir estas muestras faltantes se esperaría que la distancia entre los subclados disminuya, posiblemente de esta forma los clados de Centroamérica y la costa del Pacífico podrían considerarse un solo clado, en caso que esto ocurra se podría considerar al clado B del presente estudio como *C. castanea* sensu stricto (Velazco, 2013), debido a que la localidad tipo de la especie es Costa Rica.

El clado C es congruente con los trabajos de Hoffmann y Baker (2003), Solari y Baker (2006) y Velazco (2013) (**Fig.1**); a su vez está estrechamente relacionado con el clado de *C. benkeithi*. El clado C podría ser considerado como una especie candidata no confirmada, ya que su valor de diferenciación genética (distancia genética p corregida, 6,8%; distancia genética p no corregida, 6,4%) se encuentra dentro del valor usado para comparar entre especies estrechamente relacionadas en un determinado grupo de estudio (rango de especies hermanas en murciélagos, de 2.5% a 16.4%; Bradley y Baker, 2001), en este caso dentro del complejo *C. castanea*. Se considera especie candidata no confirmada ya que no presenta datos suficientes de morfología, ecología y de distribución, para validar los resultados moleculares (Vieites et al., 2009).

Los caracteres morfológicos tradicionales para la identificación entre especies del género *Carollia* han sido debatidos en varios estudios (Pine, 1972; McLellan, 1984; Baker et al., 2002; Muñoz et al., 2004; Pacheco et al., 2004; McLellan y Koopman, 2007; Zurc y Velasco, 2010; Murillo, 2014; Díaz y Zurc, 2015). Incluso caracteres morfológicos tales como la longitud del

antebrazo y de la tibia, usados para separar especies que anteriormente se consideraban válidas como *C. perspicillata* y *C. brevicauda* actualmente se encuentran en discusión (Díaz y Zurc, 2015); lo mismo parece suceder con las especies dentro del complejo *C. castanea*. Para realizar estudios en especies dentro del género *Carollia*, Díaz y Zurc (2015) sugieren primero realizar análisis filogenéticos con varios marcadores moleculares (genes mitocondriales y nucleares) que permitan identificar grupos filogenéticos y, posteriormente, analizar la morfología de cada grupo obtenido.

La relación entre el clado C y *C. benkeithi* reveló valores de PP y bootstrap bajos (**Fig. 2**), Velazco (2013) menciona el mismo resultado para el valor de bootstrap ($\leq 50\%$), lo que demuestra un pobre soporte entre estos dos grupos. Los valores de las distancias p corregidas obtenidas entre los dos grupos es de 6.8%, lo cual, de acuerdo a Bradley y Baker (2001), se encuentra dentro del rango indicado para especies hermanas en murciélagos (2.5% - 16.4%). El valor de la distancia indicada por Solari y Baker (2006) es de 8.1% (distancia p corregida) mientras que la indicada por Velazco (2013) es de 7.3% (distancia p no corregida), comparando estos valores con los obtenidos (distancia genética p corregida, 6,8%; distancia genética p no corregida, 6,4%) se observa una variación aproximada entre 0.9% y 1.3% mayor que las anteriormente reportadas; esta variación se puede deber a que en este estudio se usó mayor número de secuencias del oriente ecuatoriano ($n = 15$) en relación a las usadas por Solari y Baker (2006) ($n = 9$) y por Velazco (2013) ($n = 3$). Por otro lado, el valor de la distancia del clado C en relación a *C. benkeithi* es mayor al mencionado para la descripción de otras especies dentro del género, como *C. sowelli* (4.9% distancia p no corregida) (Baker et al., 2002) y *C. manu* (5% distancia p no corregida) (Velazco, 2013). Estos datos apoyan al clado C como especie candidata no confirmada.

El clado B (*C. castanea* sensu stricto) y el clado C presentaron valores altos para distancias genéticas p corregidas (9.4%) (**Tabla 1**) y no corregidas (8.6%) (**Tabla 2**) que coinciden con el rango de Bradley y Baker (2001) sugerido para murciélagos. Este valor es mayor al obtenido por Solari y Baker (2006) (8.3% distancia p corregida) y Velazco (2013) (7.9% distancia p no corregida). En 2010 se describió *Platyrrhinus angustirostris* con una distancia p no corregida del 2.7%, y a *P. fusciventris* con una distancia p no corregida del 3.1% (Velazco et al., 2010). Así mismo, en 2014 se describe a *P. guianensis* con una distancia p no

corregida del 3.8% (Velazco y Lim, 2014). Los valores de distancias genéticas de estas especies descritas son menores al obtenido para el clado C (9.4%). Estos valores apoyan, una vez más, la existencia de una especie candidata para el oriente ecuatoriano.

La distancia genética *p* corregida entre el clado B (*C. castanea* sensu stricto) y *C. benkeithi* es de 8.5%, este valor es mayor comparado con el obtenido por Solari y Baker (2006) (8.1%); así mismo la distancia *p* no corregida (7.9%) es mayor al obtenido por Velazco (2013) que fue de 8.1%. Por medio de los análisis filogenéticos se obtuvo un alto soporte para *C. benkeithi*, sin embargo, se presentó una leve politomía entre los individuos secuenciados. A partir de los análisis realizados se esperaba que *C. benkeithi* esté presente Ecuador, debido a que se desconoce su distribución exacta (Solari y Baker, 2006), sin embargo, ninguno de los especímenes del oriente ecuatoriano se agrupó con el clado que corresponde a *C. benkeithi*.

Los análisis de COI dentro del complejo *C. castanea* no presentan una resolución filogenética tan clara como los obtenidos con *Cyt-b*, se presentó una marcada politomía entre los individuos secuenciados, principalmente los individuos del clado C (**Fig. 3**). Sin embargo, el análisis filogenético de este gen sirvió para confirmar lo observado en *Cyt-b*, demostrando la parafilia con alto soporte para la especie *C. castanea* conformada por los tres clados (A, B y C). No se presentó resultados para *C. benkeithi* debido a que no existen secuencias para COI de esta especie. Por otro lado, COI no separó al clado B en subclados, por lo que todo el clado debería ser considerado como *C. castanea* sensu stricto.

Al realizar estudios en complejos de especies se deberían tomar en cuenta algunos parámetros, tales como: usar un gran número de muestras (individuos que abarquen toda la distribución de las especies de estudio), realizar revisiones morfológicas y morfométricas y añadir varios marcadores moleculares (genes mitocondriales y nucleares) (Velazco y Cadenillas, 2011).

El mapa de distribución de *C. castanea* de Ecuador (**Fig. 4**), indica individuos de los linajes determinados en el presente estudio distribuidos principalmente en tierras bajas, a ambos lados de Los Andes.

La presencia de los individuos del complejo *C. castanea* decrece conforme aumenta la elevación en las estribaciones, en congruencia con un patrón general de los murciélagos, cuya

riqueza de especies está inversamente correlacionada con la elevación (Presley et al., 2011). Este patrón se puede deber a: 1) la distribución de los recursos alimenticios, debido a que el alimento consumido por los murciélagos es abundante en zonas bajas y disminuye en riqueza y abundancia en zonas altas (Presley et al., 2011); o 2) la termorregulación, los murciélagos realizan un gran gasto energético para volar, desplazarse (von Helversen y Winter, 2003) y termorregularse, debido a que pierden calor rápidamente conforme aumenta la elevación (Speakman y Thomas, 2003).

De acuerdo a los resultados filogenéticos y por el mapa de distribución (**Fig. 4**), se sugiere que los clados dentro del complejo *C. castanea* de Ecuador se originaron por especiación alopátrica, actuando las vertientes occidentales y orientales de la cordillera de los Andes como barreras geográficas, en donde el clado B *C. castanea* sensu stricto se distribuye al occidente de la cordillera y el clado C (especie candidata) al oriente de la cordillera. En algunas especies de murciélagos el levantamiento de los Andes generó aislamiento genético y posibles eventos de vicarianza como fue propuesto para *Artibeus* (Patterson et al., 1992; Van Den Bussche et al., 1998) y *Glossophaga soricina* (Hoffmann y Baker, 2001).

El género *Carollia* se diversificó aproximadamente hace 18 millones de años (Datzmann et al., 2010; Monteiro y Nogueira, 2011; Rojas et al., 2011) durante el Mioceno temprano. Tomando esto en cuenta, el levantamiento de los Andes no está relacionado con la diversificación de las especies de *Carollia* a los dos lados de la cordillera, sino que se podría deber al intercambio entre Centroamérica y Sudamérica (Hoffmann y Baker, 2003). Sin embargo, en 2010 Datzmann y colaboradores indican que la diversificación entre *C. brevicauda* y *C. castanea* se dio hace cinco millones de años en el Mioceno tardío, por lo que se puede pensar que la diversificación de las especies del complejo *C. castanea* está relacionada al último evento del levantamiento de los Andes del norte, de cuatro a cinco millones de años (Gregory, 2000). De esta forma la distribución de los clados B y C sería alopátrica y efectivamente la cordillera de los Andes podría haber actuado en la separación de estos dos clados en Sudamérica, provocando un aislamiento en el flujo genético.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo el Contrato Marco MAE-DNB-ARRGG-CM-2014-0002 por su importancia en la referencia a las poblaciones orientales de mamíferos.

Se agradece a Santiago Burneo curador del Museo de Mastozoología, QCAZ de la PUCE por permitir el acceso a los especímenes. Al Laboratorio de Biología Molecular del QCAZ de la PUCE por las instalaciones prestadas. Al Proyecto Arca de Noé por permitir el acceso a muestras de tejidos.

LITERATURA CITADA

- ALBUJA L. 2011. Lista de mamíferos actuales del Ecuador. Instituto de Ciencias Biológicas, Escuela Politécnica Nacional, Casilla 17-01-2759, Quito.
- BAKER RJ, S SOLARI y FG HOFFMAN. 2002. A new Central American species from the *Carollia brevicauda* complex. Occasional Papers. Museum of Texas Tech University 217:1-11.
- BAKER RJ, SR HOOVER, CA PORTER y RA VAN DEN BUSSCHE. 2003. Diversification among New World leaf-nosed bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. Occasional Papers. Museum of Texas Tech University 230:1-32.
- BRADLEY RD y RJ BAKER. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. Journal of Mammalogy 82(4):960-973.
- CLARE EL, BK LIM, MD ENGSTROM, JL EGER y PD HEBERT. 2007. DNA barcoding of neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. Molecular Ecology Resources 7(2):184-190.
- CLARE EL, BK LIM, MB FENTON y PD HEBERT. 2011. Neotropical Bats: Estimating species diversity with DNA barcodes. PloS ONE 6(7):e22648. doi:10.1371/journal.pone.0022648.
- CUARTAS CA, J MUÑOZ y M GONZÁLEZ. 2001. Una nueva especie de *Carollia* Gray, 1838 (Chiroptera: Phyllostomidae) de Colombia. Actualidades Biológicas 23(75):63-73.
- DATZMANN T, O VON HELVERSEN y F MAYER. 2010. Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). BMC Evolutionary Biology 10:165.
- DÍAZ JF y D ZURC. 2015. Límites de especies de los murciélagos del género *Carollia* (Phyllostomidae: Carollinae) de Colombia basado en caracteres moleculares. Resumen, Simposio de murciélagos. II Congreso Colombiano y III Latinoamericano de Mastozoología, Bogotá.
- DRUMMOND AJ y A RAMBAUT. 2009. Bayesian evolutionary analysis by samplig trees. En: (P. Lemey, P., Salemi, P., y Vandamme, A (Eds.). The Phylogenetic Handbook: a

practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. Cambridge University Press, Cambridge.

FERGUSON JWH. 2002. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society* 75(4):509-516.

FLEMING TH. 1988. *The Short-Tailed Fruit Bat: A Study in Plant-Animal Interactions*. University of Chicago Press, Chicago.

GBIF. 2015. *Carollia castanea* en colecciones de Ecuador, Perú y Colombia. Global Biodiversity Information Facility. En línea: <<http://uat.gbif.org>> [Fecha de acceso: 2015-09].

GREGORY-WODZICKI KM. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *GSA Bulletin* 112(7):1091-1105.

HEBERT PDN, A CYWYNSKA, SL BALL Y JR WAARD. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* 270(1512):313-321.

HOFFMANN FG y RJ BAKER. 2001. Systematics of bats of the genus *Glossoophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome-*b* gene. *Journal of Mammalogy* 82(4):1092-1101

HOFFMANN FG y RJ BAKER. 2003. Comparative phylogeography of short-tailed bats (*Carollia*: Phyllostomidae). *Molecular Ecology* 12(12):3403-3414.

HUELSENBECK J y F RONQUIST. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8):754-755.

IRWIN DM, TD KOCHER y AC WILSON. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32(2):128-144.

IVANOVA NV, JR DEWAARD y PD HEBERT. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Resources* 6(4):988-1002.

KREBS J, B LEWIN, E GOLDSTEIN y S KILLPATRICK. 2013. *Lewin's Genes XI*. Jones and Bartlett Publishers.

LANFEAR R, B CALCOTT, SYW HO y S GUINDON. 2012. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29(6):1695-1701.

- LEMEY P, M SALEMI y A VANDAMME. 2009. The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. New York Cambridge University, New York.
- MCDONOUGH MM, AW FERGUSON, LK AMMERMAN, C GRANJA-VIZCAINO, SF BURNEO y RJ BAKER. 2011. Molecular verification of bat species collected in Ecuador: Results of a country-wide survey. Occasional Papers. Museum of Texas Tech University 301: 1-28.
- MCLELLAN LJ. 1984. A morphometric analysis of *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae). American Museum Novitates 2791:1-35.
- MCLELLAN LJ y KF KOOPMAN. 2007. Subfamily Carolliinae. In L. A. Gardner (Ed.), Mammals of South America, Vol. 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats. The University of Chicago Press, Chicago.
- MICKLEBURGH SP, AM HUTSON y P RACEY. 2002. A review of the global conservation status of bats. The International Journal of Conservation Oryx 36(1): 18-34.
- MONTEIRO LR y MR NOGUEIRA. 2011. Evolutionary patterns and processes in the radiation of phyllostomid bats. BMC Evolutionary Biology 11:137.
- MUÑOZ J, CA CUARTAS y M GONZÁLEZ. 2004. Se describe una nueva especie de murciélago del género *Carollia* Gray, 1838 (Chiroptera: Phyllostomidae) de Colombia. Actualidades Biológicas 26(80):80-90.
- MURILLO OE. 2014. Murciélagos de cola corta (*Carollia*: Phyllostomidae) del Parque Nacional Natural Gorgona (Colombia) y sus implicaciones biogeográficas. Revista Biología Tropical 62(1):435-445.
- NCBI. 2015. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. En línea: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> [Fecha de acceso: 2015-09].
- PACHECO V, S SOLARI y PM VELAZCO. 2004. A new species of *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae) from the Andes of Peru and Bolivia. Occasional Papers. Museum of Texas Tech University 236:1-15.

- PATTERSON BD, V PACHECO y MV ASHLEY. 1992. On the origin of the western slope region of endemism: systematics of fig-eating bats, genus *Artibeus*. *Memorias Del Museo de Historia Natural (Lima)* 21:189-205.
- PINE RH. 1972. The bats of the genus *Carollia*. Technical Monograph. Texas Agricultural Experimental Station. Texas A & M University 8:1-125.
- PRESLEY SJ, LM CISNEROS, BD PATTERSON y MR WILLIG. 2011. Vertebrate metacommunity structure along an extensive elevational gradient in the tropics: a comparison of bats, rodents and birds. *Global Ecology and Biogeography*.
- ROJAS D, A VALE, V FERRERO y L NAVARRO. 2011. When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae. *Molecular Ecology* 20(10):2217-2228.
- SOLARI S y RJ BAKER. J. 2006. Mitochondrial DNA sequence, karyotypic, and morphological variation in the *Carollia castanea* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae) with description of a new species. *Occasional Papers. Museum of Texas Tech University* 254:1-16.
- SPEAKMAN JR y DW THOMAS. 2003. Physiological ecology and energetics of bats. In T.H. Kunz y M.B. Fenton (Ed.) *Bat ecology*. University of Chicago Press, Chicago.
- TAMURA T, G STECHER, D PETERSON, A FILIPSKI y S KUMAR. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.
- TIRIRA D. 2007. Guía de campo de los mamíferos del Ecuador. Ediciones Murciélago Blanco. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador. Quito. 151pp.
- TIRIRA D. 2015. Mamíferos del Ecuador: lista actualizada de especies. Versión 2015.1. Asociación Ecuatoriana de Mastozoología y Fundación Mamíferos y Conservación. Quito. <www.mamiferosdeecuador.com> (actualización: 2015-04-14).
- VAN DEN BUSSCHE RA, JL HUDGEONS y RJ BAKER. 1998. Phylogenetic accuracy, stability, and congruence: relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura*, and *Koopmania*. In T. H. Kunz y P.A Racey (Ed.), *Bat Biology and Conservation*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.

- VELAZCO PM. 2013. On the phylogenetic position of *Carollia manu* Pacheco et al., 2004 (Chiroptera: Phyllostomidae: Carolliinae). *Zootaxa* 3718 (3):267-276.
- VELAZCO PM y R CADENILLAS. 2011. On the identity of *Lophostoma occidentale* (Davis & Carter, 1978) (Chiroptera: Phyllostomidae). *Zootaxa* 2962:1-20.
- VELAZCO PM y BK LIM. 2014. A new species of broad-nosed bat *Platyrrhinus* Saussure, 1860 (Chiroptera: Phyllostomidae) from the Guianan Shield. *Zootaxa* 3796(1):175-193.
- VELAZCO PM y BD PATTERSON. 2013. Diversification of the Yellow-shouldered bats, Genus *Sturnira* (Chiroptera, Phyllostomidae), in the New World tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68(2013):683-698.
- VELAZCO PM, AL GARDNER y BD PATTERSON. 2010. Systematics of the *Platyrrhinus helleri* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae), with descriptions of two new species. *Zoological Journal of the Linnean Society* 159(3):785-812.
- VIEITES DR, KC WOLLENBERG, F ANDREONE, J KOHLER, F GLAW y M VENCES. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidence by an integrative amphibian inventory. *PNAS* 106(20):8267-8272.
- VON HELVERSEN O y Y WINTER. 2003. Glossophagine bats and their flowers: costs and benefits for plants and pollinators. In T.H. Kunz y M.B. Fenton (Ed.) *Bat ecology*. University of Chicago Press, Chicago.
- ZURC D y P VELAZCO. 2010. Análisis morfológico y morfométrico de *Carollia colombiana* Cuartas et al., 2001 y *C. monohernandezii* Muñoz et al., 2004 (Phyllostomidae: Carolliinae) en Colombia. *Chiroptera Neotropical* 16(1):567-572.
- ZWICKL DJ. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin. 115 p.

FIGURAS

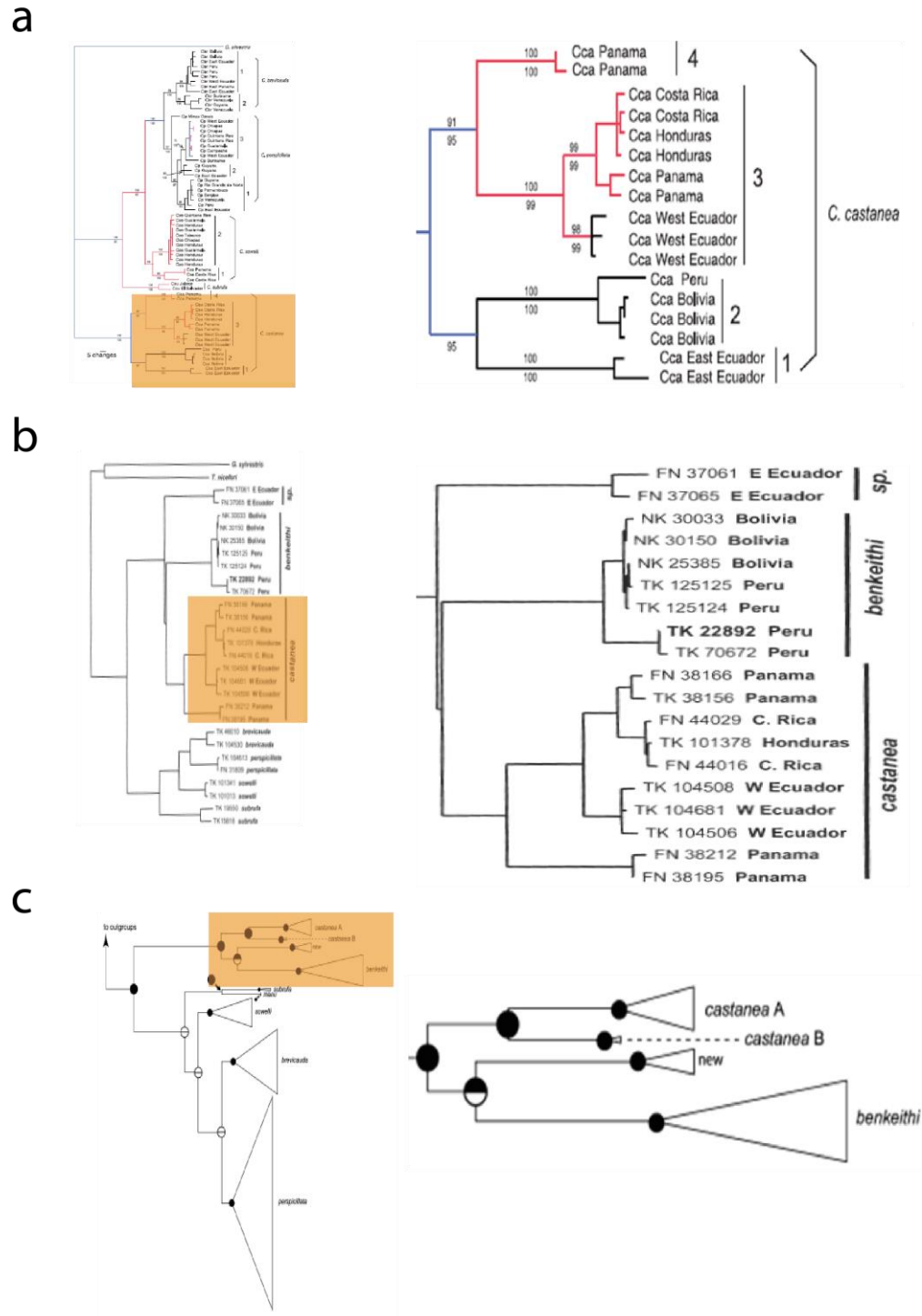


Fig 1. Filogenias de estudios en el género *Carollia* usando Citocromo *b*, en donde se observa el complejo *C. castanea*. a) Filogenia del estudio de Hoffmann y Baker en 2003. b) Filogenia del estudio de Solari y Baker en 2006. c) Filogenia del estudio de Velazco en 2013.

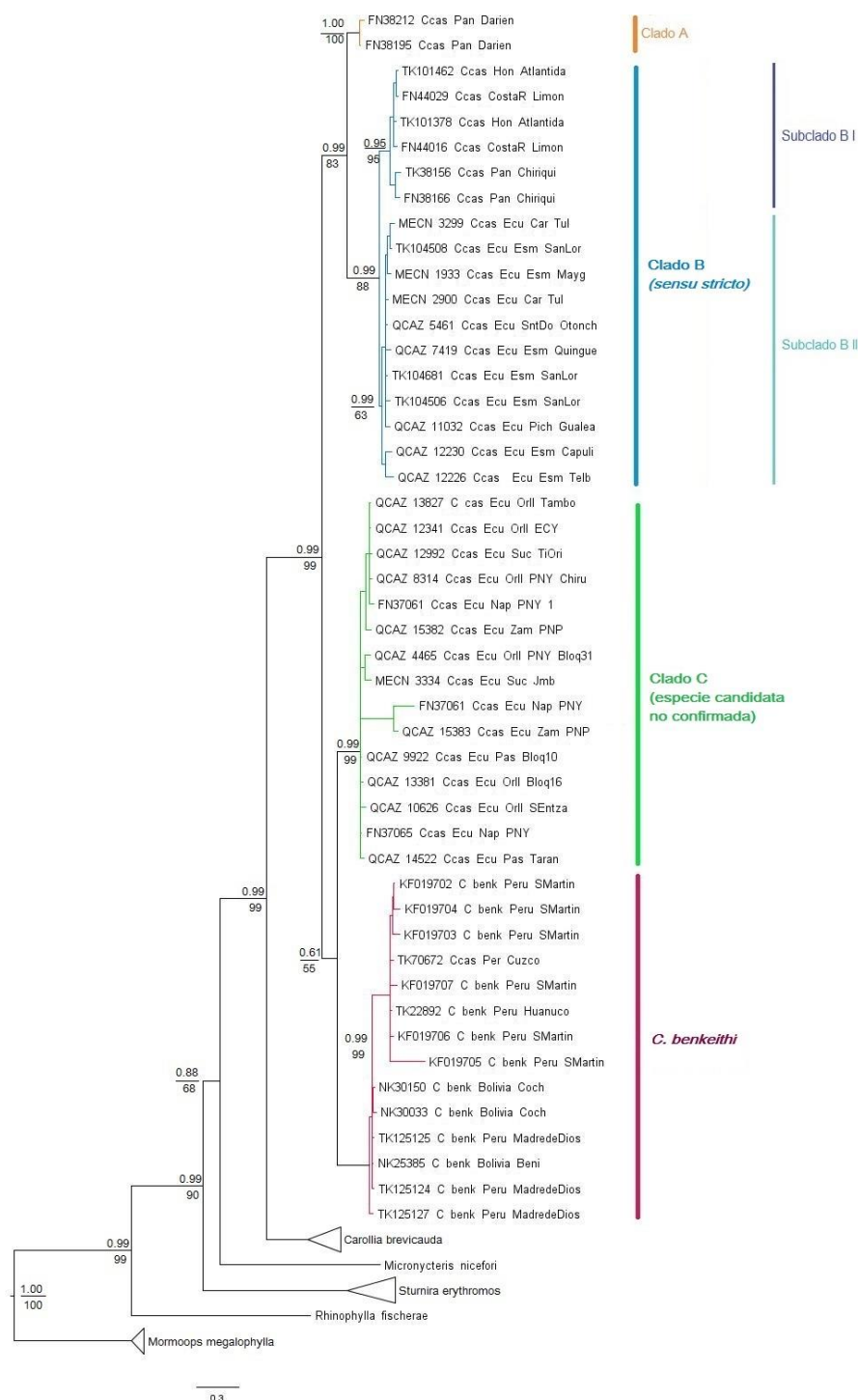


Fig 2. Filogenia del complejo *Carollia castanea*. Árbol basado en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, derivado del análisis de 1140 pb del gen mitocondrial Citocromo *b*. Cada secuencia está representada en los nodos terminales por un código (número de acceso en GenBank, exceptuando aquellos de los clados de Ecuador, que poseen el número del museo al que pertenecen, mayor información ver Apéndice 1), nombre de la especie y localidad de procedencia. Los números de los nodos representan el soporte de los clados (probabilidades posteriores en la parte superior y bootstrap en la inferior).

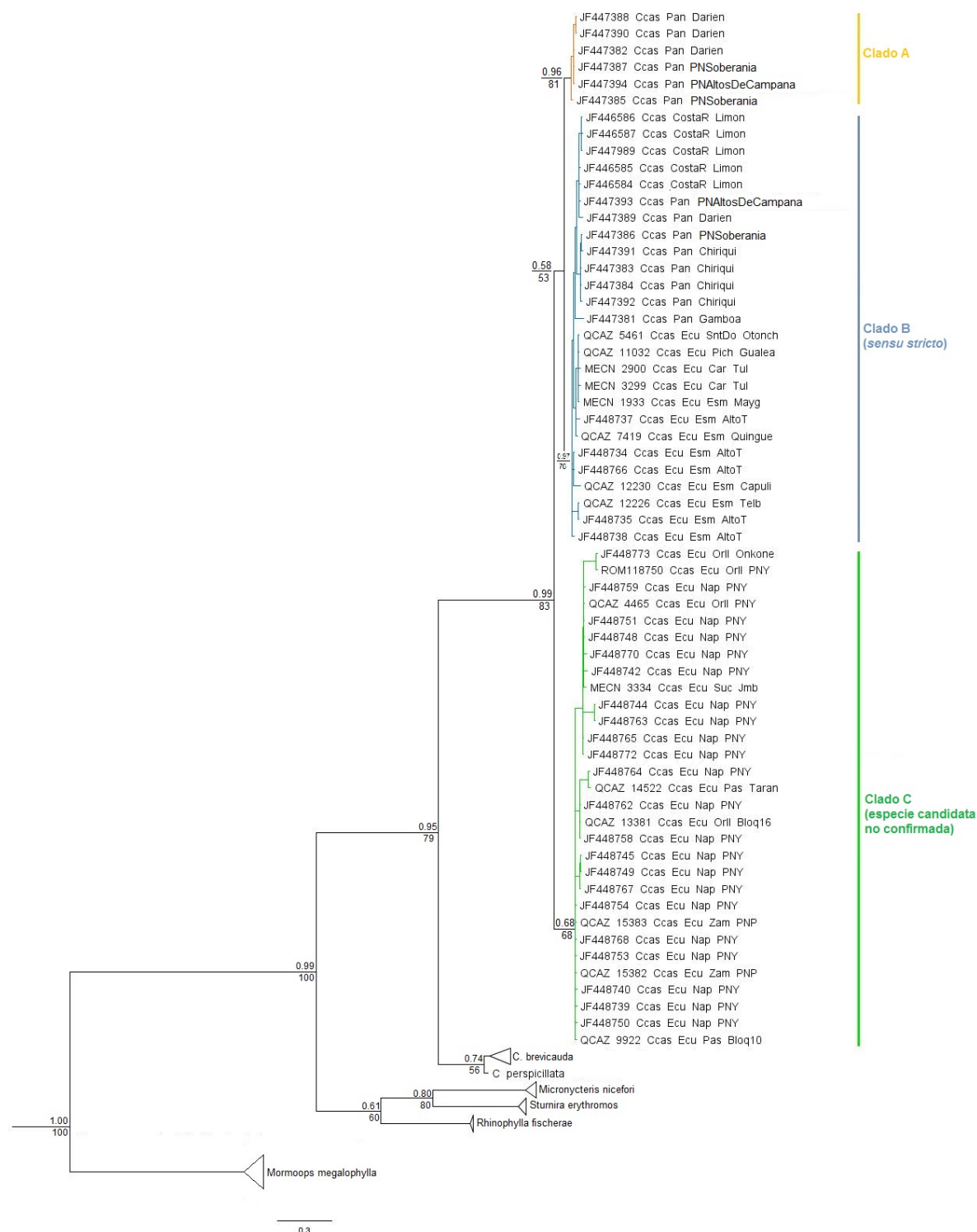


Fig 3. Filogenia del complejo *Carollia castanea*. Árbol basado en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, derivado del análisis de 602 pb del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I. Cada secuencia está representada en los nodos terminales por un código (número de acceso en GenBank, exceptuando aquellos de los clados de Ecuador, que poseen el número del museo al que pertenecen, mayor información ver Apéndice 1), nombre de la especie y localidad de procedencia. Los números de los nodos representan el soporte de los clados (probabilidades posteriores en la parte superior y bootstrap en la inferior).

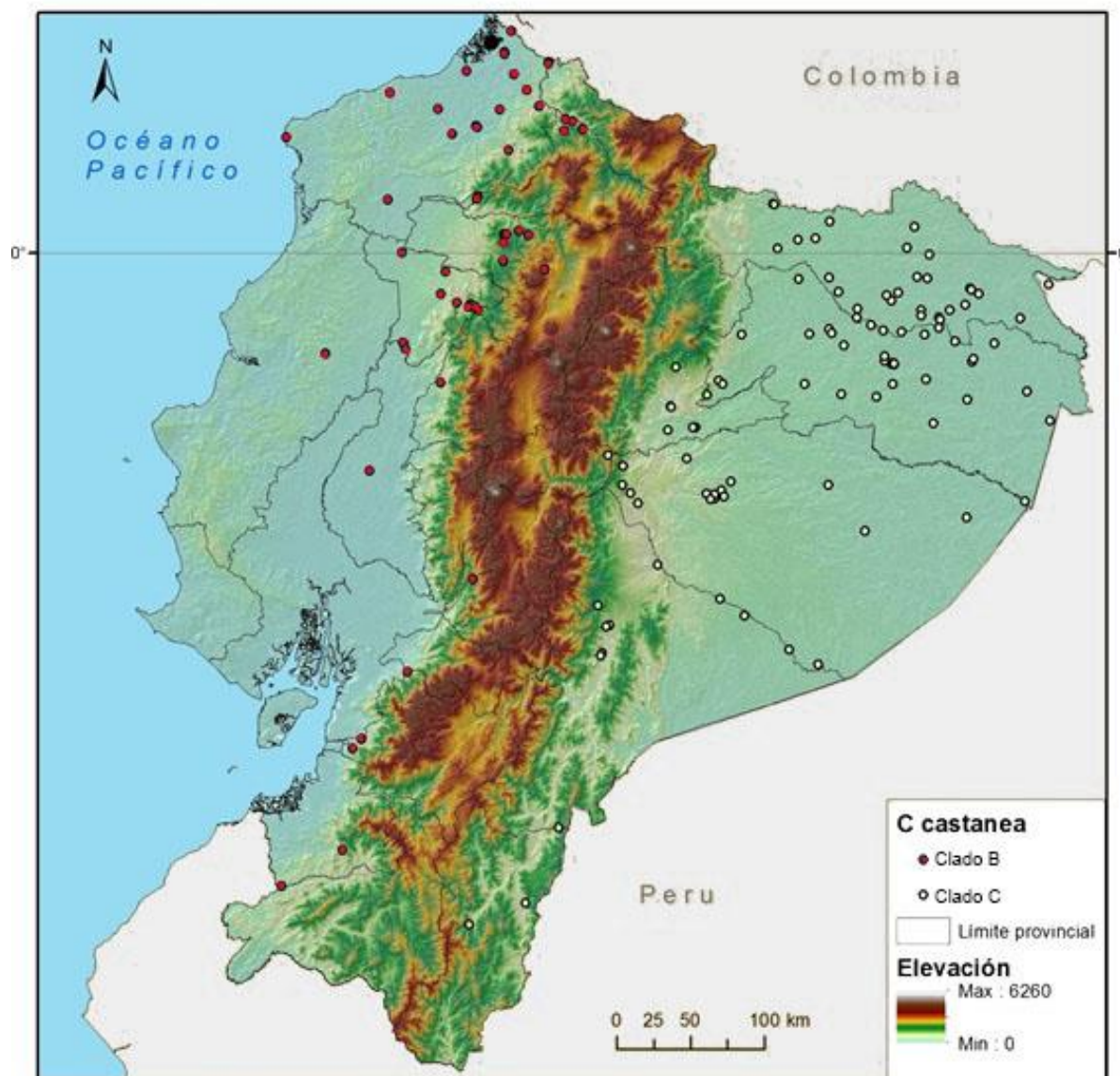


Fig 4. Mapa de distribución de *Carollia castanea* c de Ecuador. Los puntos rojos son los individuos colectados correspondientes al clado B y los puntos blancos los individuos correspondientes al clado C.

TABLAS

Tabla 1

Distancias genéticas p corregidas en base al parámetro Kimura 2 de Cyt-*b* de *C. benkeithi* y del complejo *C. castanea* en Ecuador.

	Clado A	Clado B (sensu stricto)	Clado C	<i>C. benkeithi</i>
Clado A (n = 2)	0.265			
Clado B (sensu stricto)(n = 17)	4,432 ± 0,938	1.480 ± 0.374		
Clado C (n = 15)	8,351 ± 1,382	9,354 ± 1,452	0.694 ± 0.252	
<i>C. benkeithi</i> (n = 14)	7,934 ± 1,386	8,461 ± 1,379	6,810 ± 1,186	1.040 ± 0.276

Tabla 2

Distancias genéticas p no corregidas de Cyt-*b* de *C. benkeithi* y del complejo *C. castanea* en Ecuador.

	Clado A	Clado B (sensu stricto)	Clado C	<i>C. benkeithi</i>
Clado A (n = 2)	0.265			
Clado B (sensu stricto)(n = 17)	4,256 ± 0,873	1.451 ± 0.377		
Clado C (n = 15)	7,755 ± 1,177	8,613 ± 1,224	0.689 ± 0.239	
<i>C. benkeithi</i> (n = 14)	7,426 ± 1,196	7,885 ± 1,173	6,389 ± 1,071	1.023 ± 0.271

Tabla 3

Distancias genéticas p corregidas y no corregidas de los subclados BI y BII para Cyt-*b*.

Distancias p corregidas en base al parámetro Kimura 2		
	Subclado BI	Subclado BII
Subclado BI (n = 6)	0.816 ± 0.208	
Subclado BII (n = 11)	1.735 ± 0.418	0.607 ± 0.138
Distancias p no corregidas		
	Subclado BI	Subclado BII
Subclado BI (n = 6)	0.808 ± 0.205	
Subclado BII (n = 11)	1.707 ± 0.388	0.603 ± 0.133

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Protocolo de extracción de ADN del Laboratorio de Biología Molecular del Museo de Zoología de la PUCE.

Lisis celular y proteólisis

1. Calentar el Buffer de Lisis en el microondas por pocos segundos (verificar que no queden cristales en la solución).
2. Realizar alícuotas en microtubos de 1.5ml, añadir 300ul de buffer de lisis en cada tubo (de acuerdo al número de muestras a procesar).
3. Cortar una muestra pequeña de tejido con la ayuda de pinzas y bisturí sobre un portaobjetos estéril. Transferirlo al microtubo con buffer de lisis.
4. Añadir Proteinasa K (20mg/ml) y vortear vigorosamente.
5. Incubar a 56°C durante toda la noche. Si el tejido no se ha degradado completamente, triturar con un micropistilo el tejido sobrante y añadir 1ul adicional del proteinasa K, mantener la incubación hasta que la solución esté completamente homogénea.
6. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente.

Precipitación de proteínas

7. Añadir 100ul de Solución de Precipitación a la muestra de tejido macerado, vortear a máxima velocidad por 20 segundos.
8. Centrifugar a 13500 rpm por 15 minutos.
9. Decantar rápidamente el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo de 1.5ml, descartar el tubo con el pellet.
10. Repetir el proceso de vorteadado y centrifugación.
11. Decantar el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5ml (contiene ADN), descartar el tubo con el pellet.

Precipitación de ADN

12. Añadir 300ul de Isopropanol frío al 100% a la solución de ADN, mezclar cuidadosamente el contenido invirtiendo suavemente el tubo varias veces.
13. Dejar en frío los tubos por 10 minutos. Mezclar por inversión los tubos nuevamente.
14. Centrifugar a 13500 rpm por 7 minutos.
15. Descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el pellet de ADN.
16. Añadir 300ul de etanol frío al 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el pellet.
17. Centrifugar a 13500 rpm por 7 minutos y descartar el etanol.
18. Dejar evaporar el remanente de etanol a temperatura ambiente dejando el tubo abierto (20-30 minutos).

19. Añadir 100ul de 10mMTris-HCl, pH 8.9 al pellet, dejarlo resuspender durante toda la noche a 4°C.

Tratamiento con NaOAc, rehidratación y almacenamiento del ADN

20. Añadir 10ul de 3M NaOAc, invertir el tubo varias veces.
21. Agregar 100ul de Isopropanol frío al 100%, invertir el tubo varias veces.
22. Dejar en frío los tubos por 10-15 minutos. Mezclar por inversión los tubos nuevamente.
23. Centrifugar a 13500 rpm por 12 minutos y descartar el sobrenadante.
24. Añadir 300ul de etanol frío al 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el pellet.
25. Centrifugar a 13500 rpm por 7 minutos y descartar el etanol.
26. Dejar evaporar el remanente de etanol a temperatura ambiente dejando el tubo abierto (20-30 minutos).
27. Resuspender el pellet añadiendo 50ul de 0.1 TE pH 8.0. esperar al menos una hora para cuantificar, verificando antes si el pellet de ADN se ha resuspendido completamente.
28. Cuantificar el ADN, preparar diluciones de uso. Etiquetar el ADN y guardar el stock a -20°C.

APÉNDICE 2

Protocolos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usados para la amplificación de los genes mitocondriales Citocromo *b* (Cyt-*b*) y Citocromo Oxidasa I (COI).

- Citocromo *b* (Hoffmann y Baker, 2001)
- Citocromo Oxidasa I (Clare et al., 2007)

Gen	Primers	Perfiles Termales	
Cyt- <i>b</i>	glo7L	1 ciclo	94°C por 2 minutos
			94°C por 15 segundos
	glo6H	35 ciclos	48°C por 20 segundos
			72°C por 1 minuto
		1 ciclo	72°C por 2 minutos
COI	C_VF1di	1 ciclo	94°C por 1 minuto
			94°C por 30 segundos
		5 ciclos	45°C por 40 segundos
	C_VR1di		72°C por 1 minuto
			94°C por 30 segundos
		35 ciclos	51°C por 40 segundos
			72°C por 1 minuto
		1 ciclo	72°C por 1 minuto

Cyt-*b*, citocromo *b*; COI, citocromo oxidasa I

APÉNDICE 3

La siguiente lista presenta todas las secuencias de las especies usadas en este estudio. Las secuencias de especímenes obtenidos del GenBank presentan el número de voucher y número de acceso.

Especie	Clado	País: Provincia	Voucher	# Acceso GenBank	Cyt-b	COI
<i>Carollia benkeithi</i>		BO: Beni	NK 25385	AF512002	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		BO: Cochabamba	NK 30150	AF512004	X	
<i>Carollia benkeithi</i>		BO: Cochabamba	NK 30033	AF512003	X	
<i>Carollia benkeithi</i>		PE: Cuzco	TK70672	AF187021	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE: Huánuco	TK 22892	DQ177279	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE: Madre de Dios	TK 125124	DQ177280	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE: Madre de Dios	TK 125125	DQ177281	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE: Madre de Dios	TK 125127	DQ177282	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE:San Martín	FMNH 203543	KF 019702	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE:San Martín	FMNH 203544	KF019703	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE:San Martín	FMNH 203546	KF019704	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE:San Martín	FMNH 203351	KF019705	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE:San Martín	FMNH 203353	KF019706	X	X
<i>Carollia benkeithi</i>		PE:San Martín	FMNH 203547	KF019707	X	
<i>Carollia castanea</i>	A	PA: Canal de Panamá	ROM 104275	JF447394		
<i>Carollia castanea</i>	A	PA: Darién	FN 38195	AF511992	X	X
<i>Carollia castanea</i>	A	PA: Darién	FN 38196	AF511993	X	X
<i>Carollia castanea</i>	A	PA: Darién	ROM 104341	JF447390		X
<i>Carollia castanea</i>	A	PA: Darién	ROM 104353	JF447388		X
<i>Carollia castanea</i>	A	PA: Darién	ROM 104364	JF447382		X
<i>Carollia castanea</i>	A	PA: Panamá	ROM 104212	JF447387		X
<i>Carollia castanea</i>	A	PA: Panamá	ROM 104224	JF447385		X
<i>Carollia castanea</i>	B	CR: Limón	ROM F44030	JF446587		X
<i>Carollia castanea</i>	B	CR: Limón	ROM 103587	JF447989		X
<i>Carollia castanea</i>	B	CR: Limón	ROM 108291	JF446584		X
<i>Carollia castanea</i>	B	CR: Limón	ROM 108303	JF446586		X
<i>Carollia castanea</i>	B	CR: Limón	ROM 108304	JF446585		
<i>Carollia castanea</i>	B	CR: Limón	FN 44016	AF511994	X	
<i>Carollia castanea</i>	B	CR: Limón	FN 44029	AF511995	X	
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Carchi	MECN 2900		X	X
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Carchi	MECN 3299		X	X

Especie	Clado	País: Provincia	Voucher	# Acceso GenBank	Cyt-b	COI
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	MECN 1933		X	
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	QCAZ 7419		X	
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	QCAZ 12226		X	X
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	QCAZ 12230		X	X
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	ROM 105790	JF448784		X
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	ROM 105791	JF448735		
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	ROM 105814	JF448783		
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	ROM 105815	JF448738		X
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	ROM 105816	JF448766		X
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	TK 104506	AF511998	X	X
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	TK 104508	AF511999	X	X
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Esmeraldas	TK 104681	AF512000	X	X
<i>Carollia castanea</i>	B	ECU: Pichincha	QCAZ 11032		X	X
		ECU: Sto Domingo de				
<i>Carollia castanea</i>	B	los Tsáchilas	QCAZ 5461		X	
<i>Carollia castanea</i>	B	HO: Atlántida	TK 101378	AF511996	X	
<i>Carollia castanea</i>	B	HO: Atlántida	TK 101462	AF511997	X	
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Canal de Panamá	ROM F38119	JF447393		X
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Canal de Panamá	ROM 104213	JF447386		X
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Canal de Panamá	ROM 104222	JF447381		X
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Chiriquí	FN 38166	AF512001	X	X
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Chiriquí	TK38156	AF187022	X	X
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Chiriquí	ROM 104305	JF447384		
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Chiriquí	ROM 104315	JF447392		
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Chiriquí	ROM 104316	JF447391		
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Chiriquí	ROM 104330	JF447383		X
<i>Carollia castanea</i>	B	PA: Darién	ROM F38211	JF447389		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Orellana	QCAZ 4465		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Orellana	QCAZ 8314		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Orellana	QCAZ 10626		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Orellana	QCAZ 12341		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Orellana	QCAZ 13381		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Orellana	ROM 118750	JF448773		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Pastaza	QCAZ 9922		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Pastaza	QCAZ 14522		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Sucumbíos	MECN 3334		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Sucumbíos	QCAZ 12992		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	FN 37061	AF512006	X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	FN 37065	AF512005	X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM F37105	JF448749		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM F37106	JF448751		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM F37513	JF448744		X

Especie	Clado	País: Provincia	Voucher	# Acceso GenBank	Cyt-b	COI
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM F37849	JF448753		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 103983	JF448740		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 103984	JF448739		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 104439	JF448763		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 104447	JF448742		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 104456	JF448770		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 104457	JF448745		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105184	JF448758		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105300	JF448750		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105354	JF448767		
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105615	JF448764		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105616	JF448768		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105656	JF448762		X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105900	JF448759		
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105904	JF448765		
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105954	JF448772		
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 105940	JF448748		
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Napo	ROM 106096	JF448754		
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Zamora	QCAZ 15382		X	X
<i>Carollia castanea</i>	C	ECU: Zamora	QCAZ 15383		X	X
<i>Carollia brevicauda</i> *		BO: Santa Cruz	NK 12171	AF511951	X	
<i>Carollia brevicauda</i> *		ECU: Esmeraldas	TK 104530	AF511953	X	
<i>Carollia brevicauda</i> *		ECU: Orellana	QCAZ 13828		X	X
<i>Carollia brevicauda</i> *		ECU: Orellana	QCAZ 14355		X	X
<i>Carollia brevicauda</i> *		ECU: Orellana	QCAZ 14356		X	X
<i>Carollia brevicauda</i> *		PE: Cuzco	TK 70412	AF187019	X	
<i>Carollia brevicauda</i> *		PE: San Martín	FMNH 203552	KF019712	X	
<i>Carollia brevicauda</i> *		SUR: Browsberg	ROM114048	JQ601125		X
<i>Carollia brevicauda</i> *		SUR: Browsberg	ROM 114074	JQ601130		X
<i>Carollia brevicauda</i> *		SUR: Browsberg	ROM 114096	JQ601167		X
<i>Carollia brevicauda</i> *		SUR: Browsberg	ROM 114227	JQ601301		X
<i>Carollia brevicauda</i> *		SUR: Browsberg	ROM 114249	JQ601306		X
<i>Carollia perspicillata</i> *		BR: Minais Gerais	MVZ 185533	AF511974	X	
<i>Carollia perspicillata</i> *		GUY: Demerara- Berbice		AF511979	X	
<i>Carollia perspicillata</i> *		PN: Panamá	USNM 449595	KC011594	X	
<i>Carollia perspicillata</i> *		SUR: Tafelberg	ROM 119545	JQ601363		X
<i>Carollia perspicillata</i> *		SUR: Tafelberg	ROM 119546	JQ601364		X
						X
<i>Carollia perspicillata</i> *		SUR: Tafelberg	ROM 119547	JQ601395		X
<i>Carollia perspicillata</i> *		SUR: Tafelberg	ROM 119548	JQ601420		X

Especie	Clado	País: Provincia	Voucher	# Acceso GenBank	Cyt-b	COI
<i>Carollia perspicillata</i> *		VE: Barinas	TK 19315	AF511983	X	
<i>Micronycteris nicefori</i> *		GUY: Potaro-Siparuni	ROM 107079	EF080784		X
<i>Micronycteris nicefori</i> *		CR: Limón	ROM 108330	JF446607		
<i>Micronycteris nicefori</i> *		GUY: Potaro-Siparuni	ROM 116712	JF448143		X
<i>Micronycteris nicefori</i> *		VE	TK15189	AY380749	X	X
<i>Mormoops megalophylla</i> *		GU:Alta Verapaz	ROM 98445	JF446804		X
<i>Mormoops megalophylla</i> *		GU:Alta Verapaz	ROM 98447	JF446802		
<i>Mormoops megalophylla</i> *		GU:Alta Verapaz	ROM 98448	JF446803		
<i>Mormoops megalophylla</i> *		MX	TK4833	AF338689	X	
<i>Mormoops megalophylla</i> *		VE	TK 19311	AF338688	X	
<i>Mormoops megalophylla</i> *		USA	TK 48165	AF338687	X	
<i>Mormoops megalophylla</i> *		GU: Peten	TK 169248	KC011595	X	
<i>Mormoops megalophylla</i> *		MX: Jalisco	TTU 45005	KC011683	X	
<i>Rhinophylla fischeriae</i> *		ECU: Napo	ROM 103993	JF449077		
<i>Rhinophylla fischeriae</i> *		ECU: Napo	ROM 105498	JF449083		
<i>Rhinophylla fischeriae</i> *		ECU: Napo	ROM 105675	JF448121		
<i>Rhinophylla fischeriae</i> *				AF187032	X	
<i>Sturnira erythromos</i> *		ECU: Pichincha	QCAZ 1071	JN659569		
<i>Sturnira erythromos</i> *		ECU: Pichincha	QCAZ 2100	JN659570		
<i>Sturnira erythromos</i> *		ECU: Tungurahua	QCAZ 4943	JN659571		
<i>Sturnira erythromos</i> *		PE: Huánuco	TK 22784	DQ312399	X	
<i>Sturnira erythromos</i> *		BR: Sao Paolo		JX444094	X	

Las especies que tienen * son los grupos externos. Las abreviaciones geográficas son: BO, Bolivia; BR, Brasil; CR, Costa Rica; ECU, Ecuador; GU, Guatemala; GUY, Guyana; HO, Honduras; MX, México; PA, Panamá; PE, Perú; SUR, Suriname; USA, Estados Unidos; VE, Venezuela

APÉNDICE 4

La siguiente lista presenta todas las localidades y coordenadas usadas para realizar los mapas de distribución del complejo *C. castanea* en el Ecuador.

# de Individuo	Clado	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud
MEPN 10403	B	Azuay	Santa Martha-Hacienda la Envidia	-3,036430	-79,686750
MEPN 4284	B	Cañar	Manta Real, Manglar	-2,570000	-79,350000
MEPN 2963	B	Carchi	Praderas de Miravalle	0,810000	-78,350000
MECN 2900	B	Carchi	Vía Lita	1,167661	-78,495760
MECN 3299	B	Carchi	Destacamento Tobar Donoso, Vía tras Helipuerto	1,162247	-78,495890
MEPN 2174	B	Chimborazo	Pallatanga	-2,000000	-78,950000
MEPN 10295	B	Cotopaxi	Sacha Wiwa	-0,793460	-79,150200
QCAZ 4241	B	Cotopaxi	Santa Rosa. Río Toachi	-0,348833	-78,923611
QCAZ 9428	B	El Oro	Moromoro	-3,662556	-79,744778
GBIF	B	El Oro	Río Puyango	-3,883330	-80,116670
MECN 1629	B	Esmeraldas	Mayronga, sector ENSOA, Estero	0,883333	-79,166670
MECN 1933	B	Esmeraldas	Mayronga	0,883333	-79,166670
MECN 2226	B	Esmeraldas	Recinto Durango, Bloque Quijano	1,000743	-78,624730
MEPN 2523	B	Esmeraldas	La Chiquita Campamento Forestal, 500 m Este	1,220000	-78,760000
MEPN 3195	B	Esmeraldas	Luis Vargas Torres, 2 km al sur	0,880000	-78,790000
MEPN 4333	B	Esmeraldas	Mataje, Estero Molina	1,360000	-78,720000
QCAZ 6060	B	Esmeraldas	Quingue	0,710000	-80,090000
QCAZ 2145	B	Esmeraldas	Río Cayapas, Río Chimbocal, comuna Corriente Grande	1,114167	-78,993611
QCAZ 1906	B	Esmeraldas	Río Santiago, Estero María, comuna Selva Alegre	1,114166	-78,993610
QCAZ 9022	B	Esmeraldas	San Francisco	0,629053	-78,739504
QCAZ 11460	B	Esmeraldas	San Francisco - Muisne	0,981438	-79,458771
QCAZ 12223	B	Esmeraldas	Capulí	0,730260	-79,081670
QCAZ 12224	B	Esmeraldas	Telembi	0,771070	-78,927760
QCAZ 9426	B	Esmeraldas	San Lorenzo	1,233333	-78,760000

QCAZ 2348	B	Esmeraldas	San Lorenzo, Estación La Chiquita	1,233333	-78,760000
QCAZ 24	B	Esmeraldas	Zapallo Grande	0,778140	-78,934120
GBIF	B	Esmeraldas	Alto Tambo	0,900000	-78,550000
GBIF	B	Esmeraldas	Comuna San Francisco de Bogotá	1,093560	-78,705970
GBIF	B	Esmeraldas		0,900000	-78,550000
GBIF	B	Esmeraldas	Quinindé	0,326550	-79,473140
GBIF	B	Guayas	Balao	-2,980000	-79,630000
MEPN 2906	B	Imbabura	La Carolina (Gualupe), Río Mira, Peñas Negras	0,760000	-78,290000
MEPN 3060	B	Imbabura	Lita	0,820000	-78,390000
QCAZ 3811	B	Imbabura	Río Verde. El Remolino	0,749696	-78,400469
QCAZ 4210	B	Imbabura	Unión de los ríos Verde y Guayllabamba	0,749696	-78,400469
QCAZ 4227	B	Imbabura	Río Verde.Unión del Río Verde y el Guayllabamba	0,749696	-78,400469
QCAZ 5415	B	Imbabura	Union del Rio Toachi	0,330483	-78,951470
QCAZ 5442	B	Imbabura	Unión del Toachi	0,749698	-78,400469
QCAZ 5594	B	Imbabura	Santa Rosa. Río Toachi	0,348833	-78,923611
QCAZ 10500	B	Imbabura	Santa Rosa	0,330833	-78,931947
MEPN 2779	B	Los Ríos	Río Palenque Centro Científico	-0,550000	-79,380000
GBIF	B	Los Ríos	Reserva Jauneche	-1,333000	-79,583000
GBIF	B	Los Ríos	Centro Científico Río Palenque	-0,586400	-79,364700
GBIF	B	Manabí	Bilsa	-0,617000	-79,850000
MEPN 3996	B	Pichincha	Mindo	-0,050000	-78,770000
MEPN 4815	B	Pichincha	Umachaca-Santa Rosa, Estación Biológica Maquipucuna	0,110000	-78,620000
QCAZ 34	B	Pichincha	Cerca Río Pachijal	-0,100739	-78,516470
QCAZ 1640	B	Pichincha	Nanegal, comunidad de Chacapata	0,136261	-78,676086
QCAZ 1888	B	Pichincha	Nanegal, Chacapata, Recinto Playa Rica	0,136261	-78,676086
QCAZ 1955	B	Pichincha	Nanegal, Gavilán de Orongo	0,116666	-78,766657
QCAZ 6204	B	Pichincha	Mindo. Mariposario	0,065861	-78,764972
QCAZ 11032	B	Pichincha	Gualea	0,116290	-78,748220
MEPN 4049	B	Sto Domingo de los Tsáchilas	Alluriquin	-0,330000	-78,980000
QCAZ 111	B	Sto Domingo de los Tsáchilas	Bosque Protector La Perla	0,004167	-79,386670
QCAZ 1752	B	Sto Domingo de los Tsáchilas	Tinalandia	-0,305833	-79,049167

QCAZ 4731	B	Sto Domingo de los Tsáchilas	Unión del Río Toachi.Otongachi	-0,313300	-78,967700
QCAZ 5461	B	Sto Domingo de los Tsáchilas	Otongachi	-0,330483	-78,941383
QCAZ 5794	B	Sto Domingo de los Tsáchilas	Unión del Río Toachi.Otongachi	-0,313309	-78,967660
QCAZ 6038	B	Sto Domingo de los Tsáchilas	Santo Domingo de los Colorados, Hacienda El Cortijo lote 28	-0,115260	-79,119440
GBIF	B	Sto Domingo de los Tsáchilas	Santo Domingo	-0,250000	-79,150000
QCAZ 6120	C	Imbabura	Unión del Río Toachi	0,348833	-78,941383
MEPN 9912	C	Morona Santiago	Valle del Quimi, Río Cristalino	-3,520000	-78,427470
MECN 454	C	Morona Santiago	Taisha	-2,220000	-77,300000
MECN 1362	C	Morona Santiago	Parque Nacional Sangay, Cordillera de Huamboya	-2,160000	-78,190000
QCAZ 1317	C	Morona Santiago	Río Tutanangoza	-2,450004	-78,166663
QCAZ 5691	C	Morona Santiago	Macas, platanera cerca de la ciudad	-2,280889	-78,121083
QCAZ 6152	C	Morona Santiago	Puente del Río Pastaza	-1,910000	-77,830000
QCAZ 6178	C	Morona Santiago	Antenas	-2,290000	-78,140000
GBIF	C	Morona Santiago	Suc·a	-2,467000	-78,174240
MEPN 11339	C	Napo	Challuayacu centro comunal, Parroquia Cotundo, vía Hollín Loreto	-0,700000	-77,720000
MECN 540	C	Napo	Jatun Sacha	-1,065850	-77,617610
QCAZ 5109	C	Napo	Nuevo Santo Domingo	-0,940222	-77,753000
QCAZ 5110	C	Napo	Playas del Río Hollín, 11 km E de Archidona	-0,943556	-77,748556
QCAZ 12211	C	Napo	Jatun Sacha (11)	-1,066670	-77,600000
GBIF	C	Napo	Río Jatunyacu	-1,083300	-77,766700
MECN 841	C	Orellana	73km.S., Pompeya Sur	-0,500000	-76,210000
MECN 3230	C	Orellana	Comunidad Taracoa, Sector Primavera	-0,490180	-76,772740
MEPN 3805	C	Orellana	Zaparo, campamento, PNY	-0,770000	-76,200000
MEPN 4379	C	Orellana	San José de Payamino	-0,500000	-77,320000
MEPN 7089	C	Orellana	Paushiyacu, Parroquia San José de Dahuano	-0,780000	-77,460000
MEPN 10109	C	Orellana	García Moreno, Plataforma Lobo 4	-0,493000	-76,906000
QCAZ 1297	C	Orellana	Río Tiputini, Estación Científica PUCE; P.N. Yasuní	-0,678194	-76,396556
QCAZ 1480	C	Orellana	El Edén, Río Napo bajo, cerca a la bocana del Río Yuturi	-0,539787	-76,023684
QCAZ 1528	C	Orellana	Napo-Galeras, P.N. vertiente oriental, línea 28	-0,866704	-77,530000
QCAZ 3512	C	Orellana	Estación Científica Yasuní, cueva del Saladero	-0,878329	-76,499997
QCAZ 3883	C	Orellana	Estación Científica Yasuní	-0,677194	-76,401306

QCAZ 4423	C	Orellana	Laguna de San Jose de Chamanal. Bloque 18	-0,158892	-76,975837
QCAZ 4462	C	Orellana	Helipuerto Oscar (bloque 31). Parque Nacional Yasuní. Río Rumiyacu	-0,895722	-75,947917
QCAZ 5457	C	Orellana	Parque Nacional Yasuní	-0,677194	-76,409639
QCAZ 5469	C	Orellana	Parque Nacional Yasuni	-0,677194	-76,409639
QCAZ 5475	C	Orellana	Yasuni, sendero junto a estacion de la PUCE	-0,677194	-76,409639
QCAZ 7858	C	Orellana	Campamento Chiruisla. Area de amortiguamiento del PNY	-0,665569	-75,919650
QCAZ 8007	C	Orellana	Vía Nenke-Apaika. Orillas del Río Huiririma	-0,648330	-75,913610
QCAZ 10626	C	Orellana	Saar Entza	-0,803333	-76,935556
QCAZ 10914	C	Orellana	Dumbique, bloque 15, campo Edén-Yuturi	-0,455278	-76,122222
QCAZ 12150	C	Orellana	Estación Científica PUCE P.N. Yasuní	-0,678194	-76,396556
QCAZ 12336	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Coca	-0,676862	-76,396465
QCAZ 12337	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Coca	-0,677596	-76,396621
QCAZ 12338	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Coca	-0,678075	-76,396598
QCAZ 12340	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Lagunas	-0,673641	-76,398015
QCAZ 12341	C	Orellana	Estación Científica Yasuní	-0,674064	-76,396518
QCAZ 12342	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Ceiba Coca	-0,677306	-76,395077
QCAZ 13380	C	Orellana	Parroquia Cononaco, Bloque 16, Repsol YPF-SPF, Ginta	-1,041370	-76,152100
QCAZ 13569	C	Orellana	Boa 1, 12 km SE de Taracoa	-0,566910	-76,696510
QCAZ 13740	C	Orellana	El Pantanal, cerca de Laguna Taracoa; N de Taracoa	-0,467680	-76,787375
QCAZ 13827	C	Orellana	Tambococha	-1,022530	-75,448040
QCAZ 13916	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Botánico	-0,676970	-76,398740
QCAZ 13917	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Barizo	-0,675050	-76,399930
QCAZ 13919	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Ceiba	-0,679620	-76,394580
QCAZ 13978	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Carretera a la Estación	-0,673620	-76,397540
QCAZ 13979	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Ceiba	-0,676160	-76,395900
QCAZ 13980	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Coca	-0,675880	-76,396630
QCAZ 14178	C	Orellana	Estación Científica Yasuní. Sendero Mirador	-0,675460	-76,394040
QCAZ 14646	C	Orellana	Tiputini, Bloque 43	-0,845590	-75,585555
GBIF	C	Orellana	Parque Nacional Yasuni	-0,660000	-76,450000
GBIF	C	Orellana	Onkone	-0,66	-76,45
GBIF	C	Orellana	Parque Nacional Yasuni	-0,63	-76,45

GBIF	C	Orellana	Parque Nacional Yasuni	-0,80	-76,4
GBIF	C	Orellana	Río Bununo	-0,863640	-76,712120
GBIF	C	Orellana	Río Cotapino	-0,800000	-77,433330
MECN 515	C	Pastaza	Tiguino	-1,700000	-76,570000
QCAZ 1422	C	Pastaza	Lorocachi	-1,616667	-75,949997
QCAZ 2024	C	Pastaza	Villano	-1,504168	-77,482142
QCAZ 4951	C	Pastaza	Parque Etnobotánico Omaere	-1,471084	-77,993850
QCAZ 5266	C	Pastaza	Cuevas de Mera	-1,421883	-78,042617
QCAZ 6251	C	Pastaza	Fuerte Militar Amazonas, Shell	-1,303900	-78,040100
QCAZ 8773	C	Pastaza	Taracoa	-1,420000	-76,790000
QCAZ 10041	C	Pastaza	Bloque 10. Helipuerto K4. Cercanías Río Lliquino	-1,476156	-77,485103
QCAZ 10181	C	Pastaza	Bloque 10. Campamento Villano B. Cercanías Río Lliquino	-1,453192	-77,441992
QCAZ 10321	C	Pastaza	Comunidad de Paparahua. Cercanías Río Villano	-1,489228	-77,425356
QCAZ 10675	C	Pastaza	Bloque 10. Helipuerto K10. Cercanías Río Lliquino	-1,474839	-77,531642
QCAZ 10727	C	Pastaza	Comunidad de Tarangaro. Cercanías Río Manderoyacu	-1,400650	-77,383183
QCAZ 11759	C	Pastaza	Kurintza. Comunidad	-1,506000	-77,509842
QCAZ 13330	C	Pastaza	Area Prospección AGIP. Línea Base PUCE	-1,256988	-77,654432
QCAZ 14522	C	Pastaza	Comunidad Tarangaro	-1,400621	-77,383547
GBIF	C	Pastaza	Cononaco	-1,517000	-75,600000
GBIF	C	Pastaza	Cushueme	-2,426220	-77,029880
GBIF	C	Pastaza	Río Copotaza	-2,116670	-77,450000
GBIF	C	Pastaza	Río Pindo Yaco	-1,533330	-77,950000
GBIF	C	Pastaza	Río Capahuari	-2,516670	-76,850000
MECN 231	C	Sucumbíos	San Pablo de Kantesiya	0,160000	-76,270000
MECN 3333	C	Sucumbíos	Sector AVIE, Río Bermejo	0,297198	-77,122500
MEPN 4382	C	Sucumbíos	Nueva Loja, 1 km al este	0,090000	-76,870000
MEPN 4530	C	Sucumbíos	Zábalo comuna Cofán	-0,400000	-75,630000
MEPN 4851	C	Sucumbíos	Duvuno Comuna Cofán	-0,700000	-77,720000
MEPN 4886	C	Sucumbíos	Charip, Centro Comuna, parroquia Santa Rosa de Sucumbios	0,300000	-77,130000
MEPN 5637	C	Sucumbíos	Río Aguarico, 200 m al SW de la desembocadura del río Cuyabeno	-0,250000	-75,880000
MEPN 11347	C	Sucumbíos	Marian 3 pozo, parroquia Tarapoa	-0,145000	-76,253000

QCAZ 560	C	Sucumbíos	Limoncocha, Reserva Biológica	-0,393890	-76,621760
QCAZ 959	C	Sucumbíos	Indillana, comuna, bocana del Río Indillana y Río Napo; PNY	-0,442647	-76,531488
QCAZ 11032	C	Sucumbíos	Sinangüe, Río Aguarico alto; R.E.Cayambe-Coca	0,029263	-77,100802
QCAZ 1130	C	Sucumbíos	Laguna Grande	-0,009700	-76,181670
QCAZ 3895	C	Sucumbíos	Sacha Lodge	-0,473278	-76,460139
QCAZ 3896	C	Sucumbíos	Laguna de Pañacocha	-0,396667	-76,123861
QCAZ 3910	C	Sucumbíos	Emerald Forest, sobre el río Pañayacu	-0,407139	-76,113056
QCAZ 4449	C	Sucumbíos	Comunidad de Garzacocha, Parque Nacional Yasuni	-0,483329	-76,349991
QCAZ 6849	C	Sucumbíos	Puente del Río Cuyabeno, Vía Tarapoa-Puerto El Carmen, Km 18	-0,153400	-76,191600
QCAZ 7002	C	Sucumbíos	Comunidad de Zábalo, propiedad de la Familia Criollo	-0,190550	-75,455830
QCAZ 10143	C	Sucumbíos	Comuna Yamanunka	-0,342095	-76,617023
QCAZ 10160	C	Sucumbíos	Shushufindi	-0,290000	-76,410000
QCAZ 12666	C	Sucumbíos	Amarumpoza, río Cuyabeno	-0,215731	-75,932842
QCAZ 12667	C	Sucumbíos	Quebrada Balata, río Cuyabeno bajo	-0,226053	-75,926361
QCAZ 12992	C	Sucumbíos	Cocaya Centro 1, bloque Garzacocha	-0,350068	-76,227014
QCAZ 12993	C	Sucumbíos	San Roque, bloque Garzacocha	-0,382323	-76,228088
QCAZ 13316	C	Sucumbíos	Santa Elena	-0,315235	-75,962386
QCAZ 13741	C	Sucumbíos	Nuevo Paraíso, recinto; 12 km SW de Shushufindi	-0,238884	-76,731935
QCAZ 13742	C	Sucumbíos	Los Laureles, recinto; 14 km NW de Shushufindi	-0,149262	-76,787223
QCAZ 14521	C	Sucumbíos	Pañacocha, BP, campo Tangay Este, 2 km E de muñeco Pañacocha B-10	-0,350930	-76,057852
GBIF	C	Sucumbíos	Lago Agrio	0,191670	-76,783330
GBIF	C	Sucumbíos	Zancudo	-0,550000	-75,783330
GBIF	C	Sucumbíos	Marian	0,033330	-76,316670
GBIF	C	Sucumbíos	Limoncocha	-0,240000	-76,370000
GBIF	C	Sucumbíos	Santa Cecilia	0,080000	-76,980000
GBIF	C	Sucumbíos	Kantesiya	-0,257150	-76,436680
QCAZ 6614	C	Tungurahua	Machay, vía Baños-Puyo	-1,240000	-78,130000
MEPN 11354	C	Zamora Chinchipe	Mayaycu Alto	-3,982500	-78,629722
QCAZ 15382	C	Zamora Chinchipe	Bombuscaro	-4,117897	-78,970084

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Sarah Denisse Vaca Puente, C.I. 1713758702, autora del trabajo de graduación intitulado: “SISTEMÁTICA MOLECULAR DEL COMPLEJO *Carollia castanea* Allen 1890 (CHIROPTERA:PHYLLOSTOMIDAE) EN EL ECUADOR”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 14 de Diciembre del 2015

Srta. Sarah Denisse Vaca Puente

C.I. 1713758702

